

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-228097

(43) 公開日 平成4年(1992)8月18日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/24		6807-4B		
// C 1 2 M 1/34	A	2104-4B		

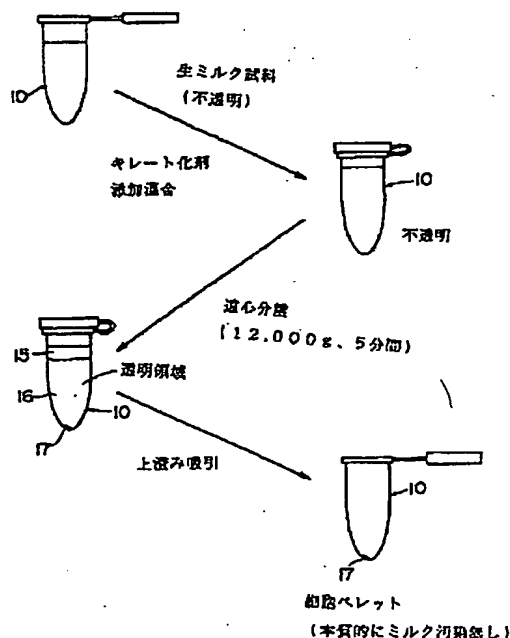
審査請求 未請求 請求項の数27(全 15 頁)

(21) 出願番号	特願平3-181799	(71) 出願人	000222118 東洋インキ製造株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番13号
(22) 出願日	平成3年(1991)6月26日	(72) 発明者	エドワード・イ・パフスキ アメリカ合衆国53559ウイスコンシン州マ ーシャル・マウネシヤドライブ514
(31) 優先権主張番号	547, 981	(72) 発明者	ランダル・エル・ダイヤモンド アメリカ合衆国53711ウイスコンシン州マ ジソン・トラヴィステラス4409
(32) 優先日	1990年7月2日	(72) 発明者	ジョーン・エツチ・ブリースト アメリカ合衆国53711ウイスコンシン州マ ジソン・センチネルパス4514
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	弁理士 小林 正明
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ミルク試料からの細胞分離および濃縮方法とそのキット

(57) 【目的】 バクテリア、イーストおよびカビのような生物体によるミルクの汚染を迅速かつ効率的な方法で測定する。

【構成】 液状ミルク試料からの細胞除去を、試料にキレート化剤を加え、所定時間試料を遠心分離にかけ、遠心分離により得られた細胞ペレットから非細胞ミルク成分を含有する上澄みを除去することによりキレート化剤により結合されたミルク成分から細胞を分離する。ペレット中の濃縮細胞は、直接細胞数を測定する標準 B r e e d S m e a r 分析を含む相対的細胞数の測定あるいは細胞を溶解する ATP の測定のような種々の技術により測定される。微生物濃度を測定する場合には、体細胞を溶解するがバクテリアまたは菌類細胞を溶解しない洗浄剤のような溶解剤を遠心分離前にミルク試料に添加する。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程からなる液状ミルク試料から細胞を分離濃縮する方法、

(a) キレート化剤をミルク試料と混合する工程、

(b) 試料を遠心分離して、他のミルク成分から遠心分離により区分されたペレット中の細胞成分を分離する工程。

【請求項2】 おもに細胞成分を含有する遠心分離で区分されたペレットから上澄みを除去する工程をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項3】 ペレットを液中に再懸濁し、懸濁液を試験して微生物細胞の濃度を測定する工程をさらに含む請求項2記載の方法。

【請求項4】 細胞ペレットから上澄みを除去する工程が、ペレット上の液体を吸引することにより実施される請求項2記載の方法。

【請求項5】 遠心分離工程の前に、体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤を試料と混合する工程をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項6】 再懸濁されたペレットを試験して、細胞タイターを測定する請求項3記載の方法。

【請求項7】 試験が、ブリードスミアー試験である請求項6記載の方法。

【請求項8】 ペレットから上澄みを除去する工程が、ペレットを液体中に再懸濁して再懸濁されたペレットにブリードスミアー試験を実施して、細胞タイターを測定する工程をさらに含む請求項5記載の方法。

【請求項9】 ペレットから上澄みを除去する工程が、細胞ペレットに溶解剤を加えて細胞を溶解し、溶解した試料を試験して試料中に存在するATPの相対的量を測定する工程をさらに含む請求項5記載の方法。

【請求項10】 溶解試料を試験する工程が、試料にルシフェラーゼ-ルシフェリン試薬を加え、試料から放出された相対的光放出量を測定する工程を含む請求項9記載の方法。

【請求項11】 液体中に細胞ペレットを懸濁し、体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤を懸濁液中に混合する工程をさらに含む請求項2記載の方法。

【請求項12】 溶解剤との混合後試料を遠心分離し、上澄みを除去し、残りのペレットを液体中に再懸濁し、細胞ペレットに微生物細胞からのATP抽出剤を添加し、そして試料のATPを定量的に試験する工程をさらに含む請求項11記載の方法。

【請求項13】 ATP抽出工程が、試料にルシフェラーゼ-ルシフェリン試薬を加え、試料から放出された光の相対的量を測定する請求項12記載の方法。

【請求項14】 ATP抽出剤が、微生物細胞を溶解する溶解剤である請求項12記載の方法。

【請求項15】 懸濁液を遠心分離し、おもに微生物細胞であるペレット中の細胞から上澄みを分離する工程を

2

さらに含む請求項11記載の方法。

【請求項16】 ペレットから分離された上澄み液を試験してATP濃度を測定する工程をさらに含む請求項15記載の方法。

【請求項17】 微生物細胞からATPを抽出する薬剤を、ペレット中の細胞に加え、ついでATPの量的水準を測定する工程をさらに含む請求項15記載の方法。

【請求項18】 ペレットから上澄みを除去し、体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤とペレット中の細胞を混合し、試料を遠心分離し、上澄み液を除去し、得られたペレット中の細胞に再度体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤を添加し、上澄みを除去し、次いで得られたペレットを微生物細胞の相対的濃度測定のために試験する工程をさらに含む請求項5記載の方法。

【請求項19】 バクテリア細胞を安定化し細胞代謝物の損失を防止する溶液中に遠心分離されたペレットを再懸濁する工程をさらに含む請求項18記載の方法。

【請求項20】 (a) キレート化剤および体細胞溶解剤を含有する透明化剤；

(b) 微生物細胞ATPを放出するATP抽出剤を含有する溶液；

(c) ATP検出試薬からなるミルク試料の試験に用いる微生物試験キット。

【請求項21】 (1) 遠心分離により得られた細胞ペレットの洗浄用溶液および(2) 緩衝液を含む請求項20の試験キット。

【請求項22】 ミルク成分から細胞を濾過するためのフィルターをさらに含有する請求項20記載の試験キット。

【請求項23】 (a) キレート化剤および体細胞溶解剤を含有する透明化剤；

(b) 細胞染色用溶液とからなるブリードスミアーのような細胞計数試験と協力してミルク試料を試験するための微生物試験キット。

【請求項24】 ミルク成分からの細胞濾過用フィルターをさらに含む請求項23記載の試験キット。

【請求項25】 (a) キレート化剤を含有する透明化剤；

(b) 体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない剤を含有する溶液；

(c) ATP検出試薬からなるミルク試料の体細胞試験用に使用する試験キット。

【請求項26】 (a) キレート化剤をミルク試料と混合する工程；

(b) ミルク成分から試料中の細胞を分離する工程、とからなる他のミルク成分から試料中の細胞を分離濃縮するための液状ミルク試料の処理方法。

【請求項27】 分離工程が、試料の遠心分離を実施して、他のミルク成分から遠心分離により除去されるペレ

3

ット中の細胞成分を分離する請求項26記載の処理方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生ミルク、殺菌ミルクおよび液状に戻した粉末ミルクのようなミルク試料中の非細胞成分からの細胞分離および濃縮に関する。

【0002】

【従来の技術】ミルク試料中の細胞計数および計量方法は、2つのカテゴリーのいずれかに属する。第1のカテゴリーでは、生ミルク試料中のウシの体細胞を、種々の手段により、感染動物におけるミルク生産の質を制限する望ましくない条件、ウシの乳腺炎を有するかも知れないミルク生産動物を識別するために計数する。乳腺炎の試験方法は、細胞のアデノシン3リン酸塩(ATP)を放出する洗浄剤のような薬剤での細胞溶解を伴う自動機器および生物発光する体細胞ATP定量を使用して、直接細胞を計数する。元々試料中に存在する体細胞の数は、放出されたATPの測定により算定される。

【0003】第2のカテゴリーでは、菌類およびバクテリアのような原核生物体が、種々の計数方法を用いてミルク試料中で計数される。これらの方法は、ミルク品質の評価に、特に全体として汚染されたミルク試料をふるいにかけるために使用される。

【0004】微生物検出用の方法では、Breed Smea r (Breed, R.S., *Zbl. Bakt. Abt. 30*: 337, 1911) が一般には最も速い方法である。この技術では、ミルク試料をスライド上になすりつけ、乾燥し、染色し、そしてバクテリアを顕微鏡検査を用いて計数する。この方法の欠点は、生存生物体、非生存生物体の両者ともに計数されること、およびミルク試料が10⁵生物体/mlよりも少ない生物体を含むときには、十分有効な結果を得るためには多数の顕微鏡視野で計数しなければならないということにある。顕微鏡検査は、退屈であり、操作者を疲労させる。

【0005】最も広く利用されるミルク微生物の検出方法は、成長培地中あるいは上に接種した後、直接コロニーを計数する標準プレート法である。標準方法 (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th Ed., 1985, Rechar dson, G.H., Ed., American Public Health Org. Washington, D.C.)は、ミルク試料用に発展し、多数の工場が手動または自動の接種方法を使用してミルク試料を検査している。これらの方法は全世界的に利用されているが、利用に当たりある種の欠点がある。第1に、手動接種方法では、統計的意味のあるプレート数を得るためにミルク試料の2つまたはそれ以上の希釈液を接種しなければならないことである。第2に、手動および自動接種方法用プレートは、通常昇温下でインキュベートされ(即ち、米国では35℃:日本では32℃)、これらの温度で好低温性生物体は抑制さ

4

れ、人工的に低いプレート計数値が提供される。最終的に、約48時間というインキュベーション期間が、バクテリアプレートの計数前に必要であり、菌類に対しては、より長いプレート期間が必要である。このインキュベーション期間中に、試料が採取された原ミルク中でバクテリア数が増加し、そして得られた結果は、試験後にミルク中のコロニーを形成する生物体の実数値を過小評価することとなる。このインキュベーション期間に対応する生ミルク処理の遅延は、生ミルクの品質を下げ、最終製品の商品寿命を短くすることとなる。

【0006】プレーティングあるいはコロニー計数方法は、手動でも自動でもよい。自動方法は、プレートルーブ方法 (Thompson, D. I. Journal of Milk and Food Technology 30, P. 273, 1967)および標準プレート計数(上記参照)を含む。

【0007】半自動あるいは自動コロニー計数方法は、Spiralプレーティング方法 (Gilchrist, J. E. Appl. Micro. 25, p244, 1973)および電子コロニー計数器 (Fleming, M.G. Ir. J. Agric. Res. 14, p.21, 1975)により実施される方法を含む。Direct Epifluorescent技術 (DEFT)は、手動により、あるいは自動機器により実施できる蛍光識別技術である。他の技術は、ミルク生物体の成長後のインピーダンス測定および放射性グルコースを利用した放射測定法を含む。

【0008】微生物評価への他のアプローチは、蛍ルシフェラーゼ (Lumac (商標)bv, オランダ)を用いたミルク中の生細胞からのATPの生物発光の利用であった。この方法では、生ミルク中のウシの体細胞をウシの細胞ATPを放出する薬剤で溶解し、このATPおよび他の非微生物ATPをATPアーゼ、普通ポテトアピラーゼで分解する。最終的には、バクテリアの溶解剤を加えそしてバクテリアATPを蛍ルシフェラーゼで測定する。多くのデータが、これらの方法に関し文献で蓄積されているが、ルシフェラーゼ反応のミルクおよび溶媒阻害、非バクテリアATPの不完全な除去、バクテリア細胞溶解の前および後におけるバクテリア検出に関するアピラーゼの有害作用 (Theron, D.N., J. Food Prot. 49:4-7, 1986)、およびバクテリアATPの非効率的な抽出により、感度は日常のミルク試験に対しては不十分であった。このタイプの分析に対する文献値 (Webster, J. A. J., Hall, M.S., Rich, C.N., Gillilliar, S.E., For, S. R., Leach, P.R., J. Food Products 51: 949-954, 1988)は、細胞感度は約1×10⁵細胞/mlであり、グレードAの生ミルクに対する受容カットオフは1×10⁵細胞/mlであるから、この分析は米国では利用できない。

【0009】試みられてきたこの方法の論理的な改良は、ATP分析の前にミルクバクテリアを濃縮することである。細胞濾過濃縮を利用する種々の技術が文献に報

告されているが (Peterkin, P.I., Sharpe, A.N., *Applied and Environ. Micro.*, 39:1138-1143, 1980)、これらの技術は全く煩わしく、遅く、そしてまだ上記した技術的問題の多くが残っている。

【0010】上記技術の全てはある程度成功したが、日常の試験に満足裡に使用できる試験のタイプをミルク工業に提供できるに十分な安価さ、簡単さ、正確さ、迅速さを提供するものではなかった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、簡単かつ信頼できる方法で実施できる、液状ミルク試料からの真核あるいは原核細胞の濃縮方法を提供する。本発明は、生ミルク、殺菌されたミルク、液状に戻した乾燥ミルク、クリーム、アイスクリームおよび他のミルク製品および誘導体を含む種々のタイプの液状ミルク製品の分析に使用できる。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、ミルク試料にキレート化剤含有透明化溶液を加え、ついで試料を短時間遠心分離にかけると等により他のミルク成分から細胞成分を分離し、そして細胞ペレットから非細胞ミルク成分を分離あるいはデカントする方法を提供する。細胞ペレットの成分は、ミルク成分を汚染すること起因する干渉がないような種々の分析を受けることができる。体細胞および微生物の両者を含有してもよい細胞ペレットは、それぞれの相対的濃度を顕微鏡的に検査して決定することができる。体細胞は、体細胞のみを溶解するように選ばれた洗浄剤のような溶解剤を透明化液中のキレート剤と共に試料へ加えて除去してもよい。遠心分離後に残っているペレットは、ほとんど微生物細胞だけを含有し、これは微生物溶解のようなATP抽出後のATP濃縮用分析を含む種々の方法で分析できる。濾過は、透明化液が加えられたミルク試料中での他のミルク成分からの細胞成分の分離にも利用できる。生ミルク試料でのウシ体細胞のような真核細胞の存在もまた、迅速かつ簡単な方法で測定できる。本発明は、バクテリア、イーストおよびカビのような種々の生物体、およびバクテリア、イーストおよびカビからの種々の胞子によるミルク試料の汚染分析にも適している。

【0013】本発明はまた、ミルクから分離された濃縮細胞材料を、染料または着色を伴う顕微鏡検査、あるいは色素産生バクテリア (chromogenic)、蛍光、化学発光あるいは他の検出可能なリポーター分子を含む他の種々のタイプの分析に利用できる。本発明はさらに、濃縮細胞材料のプレーティング用、微生物の広いスペクトルあるいは特殊なプレーティング用、あるいは通常使用されるミルク試験方法のいずれにも向く試料の調整用にも関する。

【0014】本発明では、ピートルルシフェラーゼATPの定量方法 (DeLuca, M.A., *Advances in Enzymolog*

y, Meister, A., editor, 44, 37-68, 1976)は、原液状ミルク試料中の細胞数の定量用に利用できる。このATP定量方法は、真核あるいは原核細胞数のいずれの定量化にも適用できる。分離された細胞材料は、酵素、免疫、あるいは液状ミルク試料中の特殊生物体タイプを定量あるいは同定する分子生物学的試験方法のいずれのタイプにも利用できる。

【0015】本発明の方法は、膜、中空繊維あるいは遠心分離型フィルターのような種々のタイプの濾過マトリックスにおける濾過用種々の試料の前処理方法としても使用できる。

【0016】本発明は、本発明方法の実施に使用する新規なキットをも包含する。このキットは、キレート化剤および場合によっては体細胞溶解剤を含有する透明化溶液、細胞ペレット洗浄用溶液、および、ATP検出用に、微生物細胞ATP抽出剤あるいは溶解剤、緩衝液および蛍光シフェリンのようなATP検出剤を含む。キットは、Breed Smear試験あるいは直接の微生物検査方法の他のタイプ用の試料を調整するための成分を含んでいてもよい。

【0017】本発明の他の目的、特徴および利益は添付図面と共になされる下記の詳細な説明から明らかになるであろう。

【0018】総括的には、本発明は液状ミルク試料からの細胞材料の分離および濃縮方法に関する。細胞は、キレート化剤、および場合によっては洗浄剤のような体細胞溶解剤を含有する透明化溶液をミルク試料に加え、そして細胞成分を非細胞成分から、試料を遠心分離にかけ、そして細胞ペレットから非細胞上澄みを吸引あるいはデカンティングすることによって細胞成分から非細胞成分を分離して、ミルク試料から除去される。

【0019】定義：

用語“バクテリア”は、単細胞の原核生物を含むことを意味する。“微生物”あるいは“非真核細胞”という用語に入れ換えることもまた本発明の範囲に属する。

【0020】用語“真核細胞”は、遺伝材料が核により囲まれている生物体を表示することを意図する。

【0021】用語“アデノシン-5'-3リン酸塩”(ATP)は、アデニン、D-リボースおよび3個のリン酸塩基からなるヌクレオチドを表示するように使用される。ATPは、呼吸、醗酵および光合成におけるリン酸化反応によって生成され、生物エネルギー代謝において重要である。全ての生細胞は、ATPを含有する。

【0022】用語“液状ミルク試料”は、生ミルク、超高温殺菌ミルク、低温長時間殺菌ミルク、液状に戻した粉末ミルク、クリーム、スキムミルク、液化されたアイスクリームあるいはアイスマルクあるいは関連製品、豆乳、および液状試料中のミルクあるいは乳製品の懸濁液を包含する乳の生材料あるいはコーヒー等との混合液、ミルクの培養液 (増菌培養液) 等の乳製品を起源とする

全ての液状溶液を含むことを意味する。

【0023】用語“キレート剤”あるいは“キレート化剤”は、カルシウムイオンと結合しあるいは化合し、そしてマグネシウムイオン、鉄イオン、亜鉛イオン、カドミウムイオン、ベリリウムイオン、コバルトイオン、ニッケルイオン、銅イオン、鉛イオンを包含する他の二価金属イオン、および他の金属イオンと結合してもよい全ての分子あるいは巨大分子を含むことを意味する。

“キレート剤”あるいは“キレート化剤”は、これらのイオンと結合すべく知られている全ての合成あるいは天然の有機化合物、および上記タイプのイオンに結合できる蛋白質、糖あるいは炭水化物、リピッドおよび核酸、およびこれらの組合わせを含む生物起原のいかなる分子あるいは生物起原分子の副製品あるいは修飾製品を含む。“キレート剤”あるいは“キレート化剤”は、カルシウムと結合し、そしてより少ない程度でマグネシウムおよび多分上記イオンの1つ以上と結合する天然産あるいは合成起原のいかなる固体材料をも含有する。

【0024】本発明で利用される種々の方法は、当業者に知られたものであるが、本発明に従うこれらの方法の組合わせは予測されたものではない。本発明の検定技術の一部を担う従来知られた一般的な方法は、乳製品からの微生物の標準プレーティング技術、微生物用染色および同定方法、バクテリア抽出方法、他の方法における分離、濃縮細胞材料の使用、および一般的キレート化学を含有する。上記技術の一つあるいはそれ以上の論考は下記の文献に記載され、これらは本発明の記載として引用する：Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th Ed., 1985, Richardson, G.H., Ed.; American Public Health Assoc., Washington, D.C.; Bacteriological Analytical Manual, 6th., USDA, 1984, Marcel Dekker Inc., New York; Sambrook J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Molecular Cloning, 2nd Ed., Ferguson, M., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; O'Connor, F., Australian J. Dairy Tech., June 1984, pp.61-65, 1984 (この文献は、微生物学的ミルク試験方法および各方法の関連文献を含んでいる。) ; Microbiological Reviews 44, 739-769, Karl, D.M., 1980; Martell, A.E., Chemistry of the Metal Chelate Compounds, Prentice-Hall, New York, 1952.

【0025】本発明は、液状ミルク試料からの細胞材料除去用の分離および濃縮技術を包含する。この技術を実施するには、分析されるミルク試料を図1の10に示すような適当な大きさの遠心分離容器に入れ、そしてミルクにキレート化剤を加える。キレート化剤は上記した種々のタイプのいずれでもよく、エチレンジアミン四酢酸(EDTA、商品名Versene)、ビス-(O-アミノフェノキシ)-エタン-N, N, N', N'-四酢酸(BAPTA)、エチレンジアミン四酢酸である。

アミノエチルエーテル) N, N, N', N'-四酢酸(EGTA)、ニトリロ酢酸(トリグリシン、アンモニア三酢酸塩、トリロンA)、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸(CDTA)、ジエチレントリアミノペンタ酢酸(DTPA)、クエン酸塩、アルギニン、ハイポザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン酸、ナトリウムリン酸塩ガラス(glass)あるいは“ガラス”またはポリリン酸塩における分子のいずれか、クラウンエーテルタイプ化合物およびこれら分子の全ての誘導体および前駆体を含むことができる。キレート化剤、例えばEDTAは、好ましくは液状のミルク試料に透明化溶液として添加し、そして混合物に蓋をし、反転あるいは旋回して混合する。試料は、ついで適当な大きさの遠心分離器に入れ、最小限5分間10, 000×g(最小相対遠心力)で遠心分離する。遠心分離後、3つの層に分離する。最上層は図1の15で示されるようなクリームおよびミルク蛋白質“パッド”(pad)であり、そしてこのパッドは、液状試料の上側に浮動する。パッドの下側には、図1の16で示されるような第2の“透明”(clear)液領域があり、これはミルク試料とは異なり、非不透明および半透明である。最後に、遠心分離管の底部には、細胞ペレット17があり、これの大きさは原ミルク試料の細胞数およびキレート化剤および/または洗浄剤のタイプに依存する。ペレットは少量の細胞と会合した他のミルク成分を含んでもよい。代表的な1: 0mlの生ミルク試料の透明化後には、ペレットは約10~40μlの容積であり、外観は白色または灰色がかった白色である。

【0026】本発明におけるキレート化剤の作用は、ミルク試料中におけるカゼインミセルのサブミセルへの解離である(L.C. Chaplin, J. Dairy Res. 51: 251-257, 1984)。キレート処理後には、キレート剤の無い状態でペレット化した場合とは反対にミセル状ミルク蛋白質材料は遠心分離管の上側に登りあるいは溶液中に残存する。キレート剤は、ミセル構造に寄与する主成分であるカルシウムイオンを結合する(S.H.C. Lia, Biochemistry 11: 1818-1821, 1972)。従って、本発明ではカルシウムイオンを特によく結合するキレート化剤が好ましい。

【0027】本発明の分離方法では、キレート化剤がミルクミセルに作用し、一方検査すべき細胞にはネガティブで作用しないことが非常に重要である。例えば、ピートルシフェラーゼのような微生物ATPを測定する検定方法の場合に、ミルクを透明にするが、微生物細胞ATPあるいは生存度を除き、低めあるいは消失するキレート化剤は検定方法用候補としては好ましくない。この理由により、あるタイプの適用に対して、ある種のキレート化剤が他のキレート化剤よりも優れている。特に適していると見いだされたキレート化剤は、ニトリロトリ酢酸およびエチレンジアミン四酢酸である。

【0028】生ミルク試料から体細胞を除去分離し、微生物細胞のみを分離濃縮する場合には、Triton X-100あるいはNonidet P-40 (NP-40) のような非イオン性洗浄剤をキレート化剤と共にミルク試料に加えてもよい。このような洗浄剤は特に微生物細胞を溶解することなく体細胞を溶解する。何故なら、体細胞は遠心分離前の処理で溶解され、遠心分離後にはそのままの体細胞は本質的に残存しない。引き続くこれらのペレット上でなされるATP定量は、バクテリア細胞あるいは微生物細胞のみを検出する。

【0029】他方、ミルク試料中の体細胞数を測定あるいは定量する場合には、上記洗浄剤を細胞ペレットに添加し、そして体細胞のみを溶解する。体細胞中に含有されるATPのような細胞代謝生成物は、洗浄剤で抽出できない微生物ATPにより結果の上昇を伴うことなく、容易に測定される。試料中に存在する体細胞数は、測定された既知量のATPおよび体細胞中に存在すると知られたATPの平均量を使用して計算される。この方法は従来知られた方法の改良である (R. Bossuyt, *Milchwissenschaft* 33: 11-13, 1978)。

【0030】本方法は、細胞の濃縮およびカゼインおよびカゼインミセル、親油性成分、および塩のようなバックグラウンドのミルク汚染物を除去する有用な方法を提供する。この濃縮を実施するには、例えばミルク1mlをキレート化剤と共に遠心分離により透明化し、得られたペレットを非常に少量 (例えば10 μ l) の適当な緩衝液または液体で再度懸濁させる。この例では、全部の細胞成分がミルク汚染物から除去され、そして100倍に濃縮される。この濃縮試料は、所望の他の分析に利用される。

【0031】この方法の有用性の一例は、生ミルクからの微生物を染色し計数することにある。ミルク試料がml当たり 1×10^5 よりも少ない生物体含有し、10 μ lのミルクが顕微鏡用スライドに載置され、染色された場合には、統計的に意味のある計数値を集めるため多くの視野の染色標本を観察せねばならない。視野は、他のミルク成分がバックグラウンドで染色されているため、計数することが難しい。Breed Smear法は、生ミルク品質検定のために広く、特に日本で広く使用されている。前記濃縮工程 (100倍に濃縮) を利用することにより、計数用視野はより少ない数でよく、そして視野はバックグラウンドがより奇麗なので計数はより容易である。このことは、標本作成を迅速にしかつ操作者の疲労および誤りを減少する。

【0032】ミルクの種々の他の成分から全細胞を分離し、かつ本発明の方法に従って細胞を濃縮することにより、標本中の体細胞数を決めることができる。

【0033】汚染する体細胞がないペレット中の微生物細胞を、微生物抽出剤で溶解し、ATPを検定できる。微生物細胞の数は、ATP測定および微生物細胞、ある

いは特にミルク微生物細胞に存在すると知られている平均量を用いて算定される。このタイプの方法は、標準プレーティングおよびスパイラルプレーティングのような他の方法に比して数多くの利点を提供する。第1に、他の2つの方法の48時間という時間構成とは反対に1時間という短時間で結果が利用できる。第2に、ATP測定は、細胞凝集によって影響されることのない結果が得られる。即ち、ATPは全ての細胞から測定される。；プレーティング方法では、細胞の対あるいは細胞のグループが1つのコロニーを形成するため、単一の細胞として計数される。第3には、ATP方法では、30℃より上の温度で培養するプレート計数法では測定されない好低温性生物体からのATPを測定する。

【0034】先述したように、本発明を用いて分離濃縮された細胞には、バックグラウンドを大きく減少し、濃縮により細胞数を非常に増大することで、他の種々の方法が適用できる。このことはより大きな感度の可能性と、バックグラウンドの減少による信頼できかつ再現できる結果とを提供する。

20 【0035】本発明の方法は、感度、細胞数、あるいは細胞耐久性を改良する透明化遠心分離の前または後の細胞濃厚化あるいは細胞増強化 (enhancement) 技術を含んでもよい。例えば、細胞を細胞ATPを増加する処理法 (treatments) (D.P. Teron, *J. Food Prot.* 46: 196-198, 1983) あるいは処理剤 (K.M. Oxley, *Bioluminescence and Chemiluminescence*, Ed. J. Scholmerich, John Wiley & Sons, N.Y., pp. 495-198, 1986) で処理することにより、本方法の感度は増強される。このタイプの方法は、培地の選択、あるいはポリクローマルまたはモノクローマルでさえも使用して、特殊な試料中における特殊なタイプの細胞の検出にも適用できる。

30 【0036】図1を参照して本発明を説明する。この方法では、ミルク試料をまず遠心分離容器10に入れる。次にキレート化剤場合により洗浄剤をも加える。内容物を混合した容器を遠心分離器にかけると得られた試料はいわゆる透明化される。もしキレート化剤無しのミルク試料を同様にして遠心分離にかけると、透明化せず、大きな、拡散したミルク蛋白質および細胞ペレットが管の底部にたまる。

40 【0037】本発明は、好ましくは液状ミルク試料からの細胞分離および濃縮に関する。本発明を下記の実施例によりさらに詳細に説明する。

【0038】実施例1

この実施例は、人工的に接種されたミルク試料からの微生物細胞の分離を開示する。加えて、この検定を市販の利用できるミルクATP検定と比感度について比較した。

【0039】生ミルクを地方の乳牛場から得、そしてその生ミルクを標準方法の寒天で固線培養して、個々のコロニーを分離した (*Standard Methods for the Examina*

tion of Dairy Products, 上記参照)。11個の視覚的に異なるコロニーのタイプを取り上げ、標準方法のブイヨンで成長させ、生ミルク中で見いだされる異なる種の代表的試料を得るように試みた。これらの分離物から一細胞タイプ (*Serratia liquefaciens*) を実験用に選んだ。

【0040】殺菌ミルク試料を陰性対照として使用し*

試験管	殺菌ミルク (μ l)	接種ミルク (μ l)
1	1000	0
2	999	1
3	998	2
4	995	5
5	990	10
6	980	20
7	950	50
8	900	100
9	800	200
10	500	500
11	0	1000

接種ミルク試料中の生物体数を計数するため、一夜細胞懸濁後の1000 μ lの一連の希釈液(10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷および10⁻⁸)を標準方法寒天土におき、37℃で一夜インキュベートした。データを計数する得られたコロニーは、試験管2-11のパクテリア数を計数するために使用した。

【0042】一連の8個の1.5mlマイクロ遠心分離管を試験管立におき、番号を付けた。そして1.0mlの上表の各試料1-8を各試験管に入れた。ミルクを室温(22℃)で10時間インキュベートし、500 μ lの0.25MEDTA、pH8.0、0.5%Nonidet P-40(NP-40)溶液を各試験管に加えた。試験管に蓋をし、10回逆転して混合し、そして試験管のヒンジが外側を向くように注意しながら、アングルヘッドマイクロ遠心分離器(Wheaton)のローターにおいた。試験管を12,000gで10分間遠心分離し、上澄みをフォーシットアスピレーターについている使い捨て式の1000 μ lピペットチップを使用して除去した。試験管を僅かに傾けて、得られたベレットを吸引もしくは破壊しないように、最後の残っている上澄みをアスピレーターに注いだ。

【0043】各ベレットに500 μ lの0.1MMgCl₂、0.2%NP-40溶液を加え、試験管に蓋をし、細胞がベレットに再懸濁するように旋回し、次いで試験管を前と同じように遠心分離した。遠心分離後、上澄みを再度吸引し、次いで500 μ lの0.1MMgCl₂、0.2%NP-40を各試験管に加えた。試験管に蓋をし、遠心分離し、前と同じように吸引した。

【0044】各試験管に、細胞ATPを抽出するため、50 μ lの1%トリクロロ酢酸(TCA)、1mMEDTA、0.0005%キシレノールブルー溶液を加え

*た。殺菌ミルクの1mlに、10 μ lの一夜(23℃)成長させたミルク分離バクテリアを添加した。この人工的に接種したミルク試料および未接種殺菌ミルクを使用して、多数の接種ミルク試料を下記表に示すように調整した。

【0041】

た。試験管を旋回し、室温で10分間インキュベートした。

【0045】使い捨てのピペットチップを使用して、TCA抽出物をルミノメーターキュベット(Sarstedt)に移し、400 μ lの0.1Mのトリス-酢酸緩衝液、pH7.75で中和した。ルシフェラーゼ反応を開始するため、100 μ lのルシフェラーゼ-ルシフェリン試薬(Promega, Madison, WI)を加え、次いで10秒のインテグレーション時間を用いるBerthold 9501ルミノメーター(Berthold Analytical, Munich, Germany)を用いて放出光を測定した。放出光の結果は、相対的光単位(RLU)として、記録された。

【0046】同様に調整された汚染ミルク試料(試験管1-11)を用いて、各ミルク試料の50 μ lを市販の利用できるミルクバクテリア検出キット(商品名Lumac bv, オランダ)を使用し、製造者のプロトコルに従い分析した。

【0047】これらの検定結果を図2に要約した。本発明および市販の利用できるミルク検定キットに対して、RLU(y軸)をミリリットル当たりのコロニー形成単位(CFU)におけるバクテリア数(x軸)に対してプロットした。本発明の感度は、1 \times 10⁴細胞/mlよりも小さく、一方Lumac検定の感度は約1 \times 10⁵細胞/mlであることが見いだされた。

【0048】実施例2

この実施例は、11個の生ミルク試料および1個の殺菌ミルク試料からの微生物細胞の分離を開示する。

【0049】生ミルク試料を地方の乳牛場から受け取り、4℃で貯蔵した。殺菌ミルクもまた本検査に含まれる。各ミルク試料1mlを1.5mlのエッペンドルフ試験管にピペットで入れた。この操作をそれぞれについ

て2回繰り返した。ミルク試料を室温で10分間インキュベートし、次いで0.5mlの0.5%NP-40、3%ニトリロトリ酢酸（ナトリウム塩）を各試験管に加えた。試験管に蓋をし、10回逆転して混合した。

【0050】試験管を12,000gで5分間室温で遠心分離し、上澄みを実施例1と同様にして吸引した。各ペレットに0.5mlの0.05mMMgCl₂、0.2%NP-40溶液を加え、試験管に蓋をし、旋回し、上記と同じように5分間遠心分離した。遠心分離後、上澄みを再吸引し、そして洗浄、遠心分離および吸引をもう一度繰り返した。

【0051】得られたペレットをTCA溶液で処理し、実施例1と同様に操作してルミノメーターで測定した。各試料の結果は、測定を2度繰り返した結果の平均である。各ミルク試料をもた、無菌の0.8%NaClで希釈し、1.0mlの10倍希釈液をベトリ皿にピペットで加えた。この操作もそれぞれについて2回繰り返した。約20mlの無菌標準法寒天を各皿に加え、混合した。プレートに23℃で48時間インキュベートし、コロニーを計数した。結果は2回繰り返したプレート計数値の平均である。

【0052】本実施例の結果を図3に示す。コロニー形成単位（CFU）とRLUとの間には、検査範囲にわたる直線状の対応が認められた。本データの相間計数は0.994であり、2つの方法の間に有意の相関関係があることを示す。

【0053】実施例3

本実施例は、実施例2の方法を変更した方法を使用した65個の生ミルクからの微生物細胞の分離を開示する。

【0054】ミルク試料を、微生物ペレットの処理にプロテアーゼ処理を加えた外は実施例2と同様に処理した。

【0055】第1の遠心分離工程の後に、得られたペレットを500μlの0.05mMMgCl₂、0.2%NP-40、および30μgのα-キモトリプシン（Sigma, Cat. C7762）に溶解した。ペレットを2秒間で3回逆転し、そして試験管を室温で20分間インキュベートした。残りの工程は実施例2と同様に操作した。

【0056】図4は、この方法による65個の生ミルクにおけるCFU/mlとRLUとの相関関係を示す。2つの方法の間に正の相関関係があることを示している。

【0057】実施例4

本実施例は、実施例3の方法を変更した方法を使用した88個の生ミルクからの微生物細胞の分離を開示する。

【0058】各生ミルク試料1.0mlに500μlの3%ニトリロトリ酢酸（ナトリウム塩）溶液、0.5%Triton X-100を加え、ついで実施例3と同様に処理した。第1の遠心分離工程からの上澄みを吸引した後、0.05mMMgCl₂、0.01%ポリスチレン粒子（0.984μm, Bangs Labs, Carmel）を含

有する0.2%Triton X-100および60μg/mlのα-キモトリプシンの溶液を加えた。ポリスチレン粒子は、遠心分離により細胞と共に除去された。試料をインキュベートし、遠心分離し、実施例3と同様にして吸引し、そしてペレットを0.05mMMgCl₂、0.2%Triton X-100に再懸濁し、逆転し、再度遠心分離を実施した。残りの工程は、実施例3と同様に実施した。本実施例の結果を、図5に示す。2つの方法間に正の相関関係が認められた。

【0059】実施例5

本実施例は、実施例4の方法を変更した方法を使用し、18個の生ミルクからの微生物細胞の分離を開示する。

【0060】本実施例では、第1のミルク処理工程で担体ポリスチレン粒子（実施例4と同じ）の等量を3%ニトリロトリ酢酸（ナトリウム塩）、0.5%Triton X-100溶液に加えた。担体は次からの工程では加えなかった。さらにα-キモトリプシンを第1の洗浄溶液における150μm/mlの第1の濃縮として使用した。残りの方法は、実施例4と同様に操作した。

【0061】図6に相関関係の結果を示す。2つの方法の間に相関関係が認められた。

【0062】実施例6

本実施例は、濾過装置を使用する本発明の有用性を開示する。

【0063】1組の接種された殺菌ミルク試料を実施例1と同様にして調製した。実施例1における試験管1-11に対応する試料を使用した。

【0064】各試料に、300μlの0.5MのEDTA、pH8.0、および300μlの1%NP-40を加えた。試験管に蓋をし、混合するために10X旋回し、そして12,000gで10分間遠心分離した。上澄みを吸引により除去し、ペレットを200μlの0.1mMMgCl₂、0.2%NP-40中に再懸濁するために旋回して懸濁させた。細胞懸濁液をスピン濾過装置（Millipore, UltrafreeMC, 0.45μm）に入れ、12,000gで10分間遠心分離した。遠心分離後、フィルターインサートを蓋の無い無菌のマイクロ遠心分離管に入れ、50μlの1%TCAを加え、室温で10分間インキュベートした。フィルターおよびホルダーを10分間再度遠心分離してTCA抽出物を集め、実施例1と同様に操作して分析した。

【0065】本実施例の結果を図7に、そして濾過タイプフォーマットにおける本発明の有用性を示す。本実施例で検査した細胞範囲にわたって、RLUが投与量と良い応答を示した。

【0066】液状ミルク試料からの細胞成分分析用キットは、下記の成分からなる：ATP検出に使用する微生物試験キットは、

(a) キレート化剤含有透明化溶液およびキレート化

剤および下記洗浄剤のような体細胞溶解洗浄剤、

(b) 場合により、細胞ペレット洗浄用溶液、

(c) 微生物細胞放出用の上記したような細胞溶解溶液のようなATP抽出剤、

(d) 場合により、緩衝液、

(e) ルシフェラーゼ-ルシフェリンのようなATP検出剤からなる。

【0067】Breed Smearを使用する微生物検出キレートは、

(a) キレート化剤含有透明化溶液および上記したような体細胞溶解洗浄剤、

(b) 場合により、細胞洗浄用の溶液、

(c) 細胞染色用溶液からなる。

【0068】ATP検出を使用するウシ体細胞試験キットは、

(a) 上記したようなキレート化剤を含有する透明化溶液、

(b) 微生物細胞を溶解しない体細胞溶解溶液、

(c) ルシフェラーゼ-ルシフェリンのようなATP検出試薬からなる。

【0069】上記キットのそれぞれは、実施例6に述べたようなフィルターを場合により含んでもよい。

【0070】本発明は、開示した具体例に限定されるものではなく、本発明の範囲に入る各種の変形を包含する。

【0071】本発明の実施態様を次に示す。

【0072】

【請求項1】 下記工程からなる液状ミルク試料から細胞を分離濃縮する方法、

(a) キレート化剤をミルク試料と混合する工程、

(b) 試料を遠心分離して、他のミルク成分から遠心分離により除かれるペレット中の細胞成分を分離する工程。

【0073】

【請求項2】 おもに細胞成分を含有する遠心分離で除かれるペレットから上澄みを除去する工程をさらに含む請求項1記載の方法。

【0074】

【請求項3】 ペレットを液中に再懸濁し、懸濁液を試験して微生物細胞の濃度を測定する工程をさらに含む請求項2記載の方法。

【0075】

【請求項4】 細胞ペレットから上澄みを除去する工程が、ペレット上の液体を吸引することにより実施される請求項2記載の方法。

【0076】

【請求項5】 遠心分離工程の前に、体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤を試料と混合する工程をさらに含む請求項1記載の方法。

【0077】

【請求項6】 溶解剤が、非イオン性洗浄剤である請求項5記載の方法。

【0078】

【請求項7】 キレート化剤が、エチレンジアミン四酢酸である請求項1記載の方法。

【0079】

【請求項8】 キレート化剤が、ニトリロトリ酢酸である請求項1記載の方法。

【0080】

【請求項9】 キレート化剤が、ビス-(α -アミノフェノキシ)-エタン-N, N, N', N'-四酢酸、エチレングリコール-ビス-(β -アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-四酢酸、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸、ジエチレントリアミノペンタ酢酸、クエン酸塩、アルギニン、ハイポザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン酸、ナトリウムリン酸塩ガラス、クラウンエーテルタイプ化合物および誘導体およびこれらの前駆体からなる群から選ばれたものである請求項1記載の方法。

20 【0081】

【請求項10】 再懸濁されたペレットを試験して、細胞タイターを測定する請求項3記載の方法。

【0082】

【請求項11】 試験が、ブリードスミアー試験である請求項10記載の方法。

【0083】

【請求項12】 ペレットから上澄みを除去する工程が、ペレットを液体中に再懸濁して再懸濁されたペレットにブリードスミアー試験を実施して、細胞タイターを測定する工程をさらに含む請求項5記載の方法。

30 【0084】

【請求項13】 ペレットから上澄みを除去する工程が、細胞ペレットに溶解剤を加えて細胞を溶解し、溶解した試料を試験して試料中に存在するATPの相対的量を測定する工程をさらに含む請求項5記載の方法。

【0085】

【請求項14】 溶解試料を試験する工程が、試料にルシフェラーゼ-ルシフェリン試薬を加え、試料から放出された相対的光放出量を測定する工程を含む請求項13記載の方法。

【0086】

【請求項15】 液体中に細胞ペレットを懸濁し、体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤を懸濁液中に混合する工程をさらに含む請求項2記載の方法。

【0087】

【請求項16】 溶解剤との混合後試料を遠心分離し、上澄みを除去し、残りのペレットを液体中に再懸濁し、細胞ペレットに微生物細胞からのATP抽出剤を添加し、そして試料のATPを定量的に試験する工程をさらに含む請求項15記載の方法。

50

【0088】

【請求項17】 ATP抽出工程が、試料にルシフェラーゼールシフェリン試薬を加え、試料から放出された光の相対的量を測定する請求項16記載の方法。

【0089】

【請求項18】 ATP抽出剤が、微生物細胞を溶解する溶解剤である請求項16記載の方法。

【0090】

【請求項19】 懸濁液を遠心分離し、おもに微生物細胞であるペレット中の細胞から上澄みを分離する工程をさらに含む請求項15記載の方法。

【0091】

【請求項20】 ペレットから分離された上澄み液を試験してATP濃度を測定する工程をさらに含む請求項19記載の方法。

【0092】

【請求項21】 ATPの試験工程が、上澄みにルシフェラーゼールシフェリン試薬を添加し、試料から放出された相対的光を測定する工程を含む請求項20記載の方法。

【0093】

【請求項22】 微生物細胞からATPを抽出する薬剤を、ペレット中の細胞に加え、ついでATPの量的水準を測定する工程をさらに含む請求項19記載の方法。

【0094】

【請求項23】 ATP抽出剤が、溶解剤である請求項22記載の方法。

【0095】

【請求項24】 ATP水準の試験工程が、試料にルシフェラーゼールシフェリン試薬を加え、試料から放出された相対的光を測定する工程からなる請求項22記載の方法。

【0096】

【請求項25】 ペレットから上澄みを除去し、体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤とペレット中の細胞を混合し、試料を遠心分離し、上澄み液を除去し、得られたペレット中の細胞に再度体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない溶解剤を添加し、上澄みを除去し、次いで得られたペレットを微生物細胞の相対的濃度測定のために試験する工程をさらに含む請求項5記載の方法。

【0097】

【請求項26】 バクテリア細胞を安定化し細胞代謝物の損失を防止する溶液中に遠心分離されたペレットを再懸濁する工程をさらに含む請求項25記載の方法。

【0098】

【請求項27】 安定化溶液が、マグネシウムイオンを含有する請求項26記載の方法。

【0099】

【請求項28】 安定化溶液が、プロテアーゼを含有す

る請求項26記載の方法。

【0100】

【請求項29】 プロテアーゼ含有溶液に遠心分離されたペレットを再懸濁する工程をさらに含む請求項2記載の方法。

【0101】

【請求項30】 (a) キレート化剤および体細胞溶解剤を含有する透明化剤；

(b) 微生物細胞ATPを放出するATP抽出剤を含有する溶液；

(c) ATP検出試薬

からなるミルク試料の試験に用いる微生物試験キット。

【0102】

【請求項31】 (1) 遠心分離により得られた細胞ペレットの洗浄用溶液および(2) 緩衝液を含む請求項30の試験キット。

【0103】

【請求項32】 ATP検出試薬がルシフェラーゼールシフェリンである請求項30記載の試験キット。

20 【0104】

【請求項33】 ATP抽出剤が微生物細胞を溶解する溶解剤である請求項30記載の試験キット。

【0105】

【請求項34】 体細胞溶解剤が非イオン性洗浄剤である請求項30記載の試験キット。

【0106】

【請求項35】 キレート化剤がエチレンジアミン四酢酸である請求項30記載の試験キット。

【0107】

【請求項36】 キレート化剤がニトリロトリ酢酸である請求項30記載の試験キット。

【0108】

【請求項37】 キレート化剤が、ビスー(〇-アミノフェノキシ)-エタン-N, N, N', N'-四酢酸、エチレングリコールビスー(β-アミノエチルエーテル)N, N, N', N'-四酢酸、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、クエン酸塩、アルギニン、ハイポザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン酸、ナトリウムリン酸塩ガラス、クラウンエーテルタイプ化合物および誘導体およびこれらの前駆体からなる群から選ばれたものである請求項30記載の試験キット。

【0109】

【請求項38】 ATP抽出剤が、トリクロロ酢酸溶液である請求項30記載の試験キット。

【0110】

【請求項39】 ATP抽出剤溶液が、エチレンジアミン四酢酸およびキシレノールブルーをも含有する請求項38記載の試験キット。

【0111】

【請求項40】 ミルク成分から細胞を濾過するためのフィルターをさらに含有する請求項30記載の試験キット。

【0112】

【請求項41】 (a) キレート化剤および体細胞溶解剤を含有する透明化剤；

(b) 細胞染色用溶液

とからなるブリードスミアーのような細胞計数試験と協力してミルク試料を試験するための微生物試験キット。

【0113】

【請求項42】 遠心分離から得られた細胞ペレットの洗浄溶液をさらに含有する請求項41記載の試験キット。

【0114】

【請求項43】 体細胞溶解剤が、非イオン性洗浄剤である請求項41記載の試験キット。

【0115】

【請求項44】 透明化剤が、エチレンジアミン四酢酸である請求項41記載の試験キット。

【0116】

【請求項45】 キレート化剤が、ニトリロトリ酢酸である請求項41記載の試験キット。

【0117】

【請求項46】 キレート化剤が、ビスー（O-アミノフェノキシ）-エタン-N, N, N', N'-四酢酸、エチレングリコール-ビスー（β-アミノエチルエーテル）N, N, N', N'-四酢酸、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、クエン酸、アルギニン、ハイボザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン酸、ナトリウムリン酸塩ガラス、クラウンエーテルタイプ化合物および誘導体およびこれらの前駆体からなる群から選ばれたものである請求項30記載の試験キット。

【請求項47】 ミルク成分からの細胞濾過用フィルターをさらに含む請求項41記載の試験キット。

【0118】

【請求項48】 (a) キレート化剤を含有する透明化剤；

(b) 体細胞を溶解するが微生物細胞を溶解しない剤を含有する溶液；

(c) ATP検出試薬からなるミルク試料の体細胞試験用に使用する試験キット。

【0119】

【請求項49】 ATP検出試薬が、ルシフェラーゼ-ルシフェリンである請求項48記載の試験キット。

【0120】

【請求項50】 体細胞溶解剤が、非イオン性洗浄剤である請求項48記載の試験キット。

【0121】

【請求項51】 キレート化剤が、エチレンジアミン四酢酸である請求項48記載の試験キット。

【0122】

【請求項52】 キレート化剤が、ニトリロトリ酢酸である請求項48記載の試験キット。

【0123】

【請求項53】 キレート化剤が、ビスー（O-アミノフェノキシ）-エタン-N, N, N', N'-四酢酸、エチレングリコール-ビスー（β-アミノエチルエーテル）N, N, N', N'-四酢酸、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、クエン酸、アルギニン、ハイボザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン酸、ナトリウムリン酸塩ガラス、クラウンエーテルタイプ化合物および誘導体およびこれらの前駆体からなる群から選ばれたものである請求項48記載の試験キット。

【請求項54】 ミルク成分からの細胞濾過用のフィルターをさらに含む請求項48記載の試験キット。

【0124】

20 【請求項55】 (a) キレート化剤をミルク試料と混合する工程；

(b) ミルク成分から試料中の細胞を分離する工程、とからなる他のミルク成分から試料中の細胞を分離濃縮するための液状ミルク試料の処理方法。

【0125】

【請求項56】 分離工程が、試料の遠心分離を実施して、他のミルク成分から遠心分離により除去されるペレット中の細胞成分を分離する請求項55記載の処理方法。

【0126】

【請求項57】 細胞の分離工程が、細胞をブロックし、キレート化剤と結合した他のミルク成分を通過するフィルターで試料を濾過する工程を含む請求項55記載の処理方法。

【0127】

【請求項58】 おもに細胞成分を含有するペレットから上澄みを除去する工程をさらに含む請求項56記載の処理方法。

【0128】

40 【請求項59】 キレート化剤が、エチレンジアミン四酢酸である請求項55記載の処理方法。

【0129】

【請求項60】 キレート化剤が、ニトリロトリ酢酸である請求項55記載の処理方法。

【0130】

50 【請求項61】 キレート化剤が、ビスー（O-アミノフェノキシ）-エタン-N, N, N', N'-四酢酸、エチレングリコール-ビスー（β-アミノエチルエーテル）N, N, N', N'-四酢酸、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸、ジエチレントリアミン

ペンタ酢酸、クエン酸、アルギニン、ハイボザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン酸、ナトリウムリン酸塩ガラス、クラウンエーテルタイプ化合物および誘導体およびこれらの前駆体からなる群から選ばれたものである請求項55記載の処理方法。

【0131】

【請求項62】 キレート化剤および体細胞溶解剤が、液体中における溶液であることからなるミルク試料に使用するための透明化剤。

【0132】

【請求項63】 体細胞溶解剤が、非イオン性洗浄剤である請求項62記載の透明化剤。

【0133】

【請求項64】 キレート化剤が、エチレンジアミン四酢酸である請求項62記載の透明化剤。

【0134】

【請求項65】 キレート化剤が、ニトリロトリ酢酸である請求項62記載の透明化剤。

【0135】

【請求項66】 キレート化剤が、ビス- (O-アミノフェノキシ) -エタン-N, N, N', N'-四酢酸、エチレングリコール-ビス- (β-アミノエチルエーテル) N, N, N', N'-四酢酸、トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、クエン酸、アルギニン、ハイボザンチン、4, 5-ジヒドロキシベンゼン-1, 3-ジスルホン

酸、ナトリウムリン酸塩ガラス、クラウンエーテルタイプ化合物および誘導体およびこれらの前駆体からなる群から選ばれたものである請求項62記載の透明化剤。

【図面の簡単な説明】

【図1】 液状ミルク試料を使用する本発明の一般的工程を示す。

【図2】 実施例1の試料中の微生物濃度に対して本発明の方法および他の方法に従って分析された試料中の相対的光単位 (RLU) を示すグラフである。

10 【図3】 実施例2におけるミルクからの微生物細胞の分離に対するコロニー形成単位 (CFU) とRLUとの相間関係を示すグラフである。

【図4】 実施例3における微生物細胞の分離に対するCFUとRLUとの相間関係を示すグラフである。

【図5】 実施例4における微生物細胞の分離に対するCFUとRLUとの相間関係を示すグラフである。

【図6】 実施例5における微生物細胞の分離に対するCFUとRLUとの相間関係を示すグラフである。

【図7】 実施例6で試験された試料中における人工的に接種された量とRLUとの相間関係を示すグラフである。

【符号の説明】

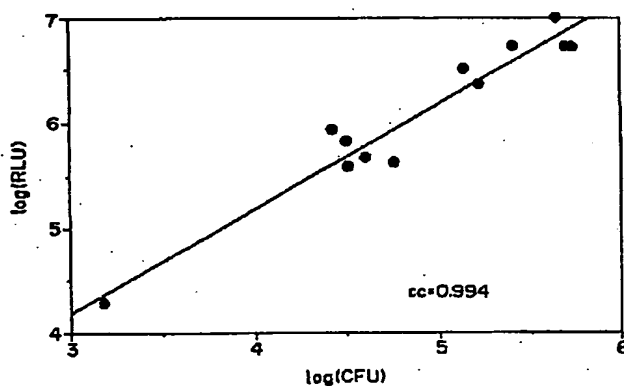
10 : 遠心分離容器

15 : パッド

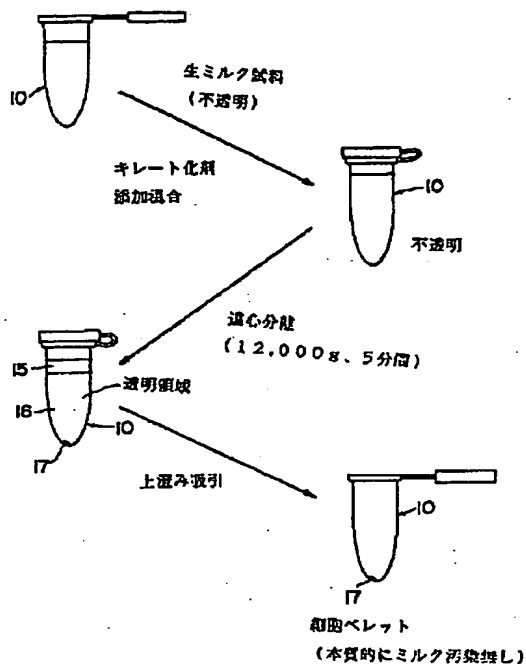
16 : 透明液領域

17 : 細胞ベレット

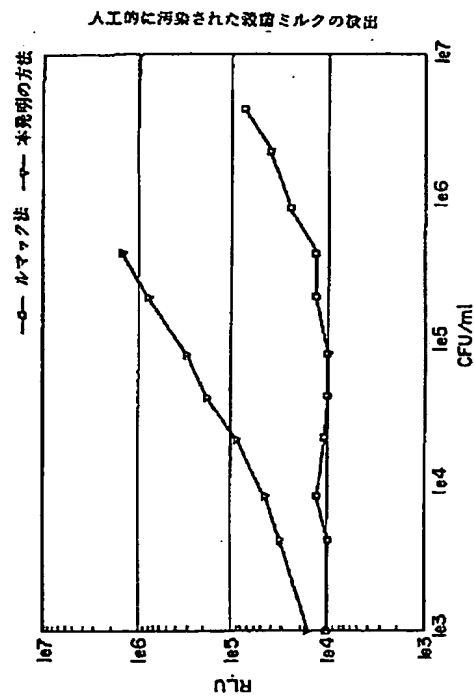
【図3】



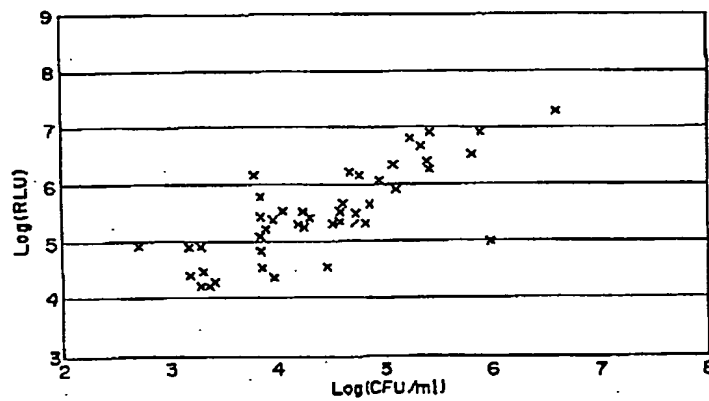
【図1】



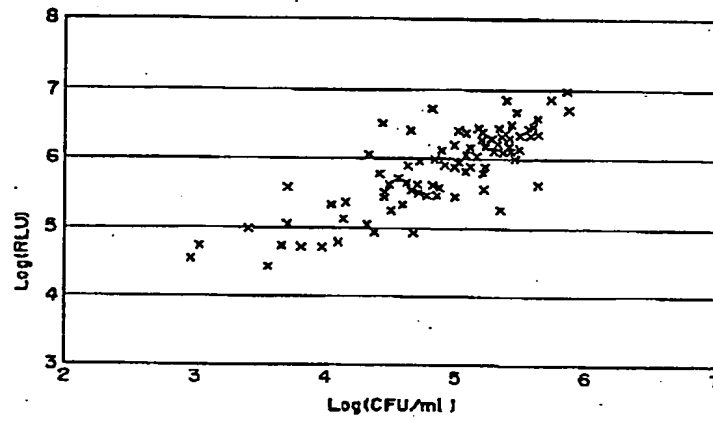
【図2】



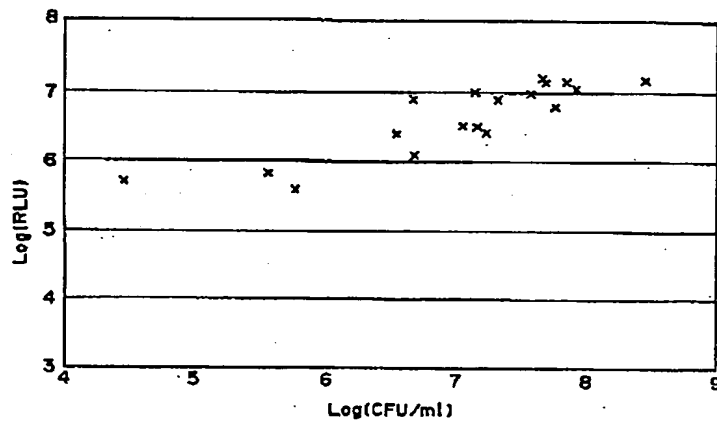
【図4】



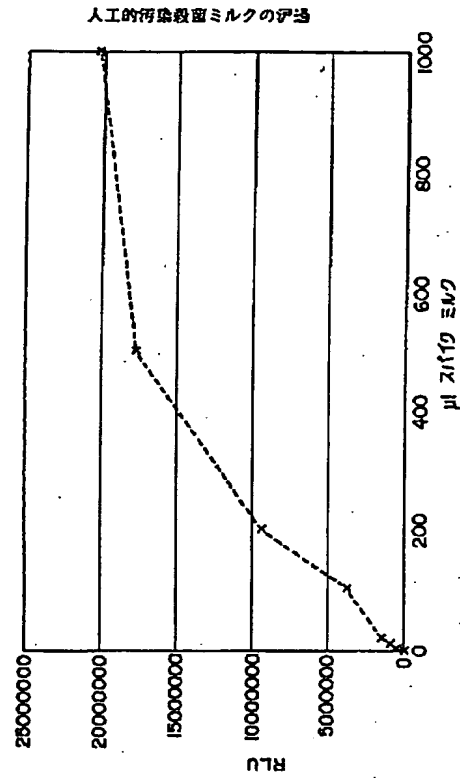
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 リサ・エス・マーティン
 アメリカ合衆国53589ウイスコンシン州ス
 トツフトン・エヌ・アカデミストリート
 217

(72)発明者 カスリーン・ケイ・ニーセン
 アメリカ合衆国53705ウイスコンシン州マ
 ジソン・ツヴェルグデアー., 3717